

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwig

DIE KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION MIT DEM EQUINEN
RHINOVIRUSSTAMM NM₁₁ UND IHRE EIGNUNG
ZUR SEROLOGISCHEN DIAGNOSTIK DER ERKRANKUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Walter Becker
Tierarzt aus Balhorn
Berlin 1972
Journal-Nr. 768

Aus dem Institut für Veterinär-Hygiene
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. H. Hartwigk

DIE KOMPLEMENTBINDUNGSREAKTION MIT DEM EQUINEN
RHINOVIRUSSTAMM NM₁₁ UND IHRE EIGNUNG
ZUR SEROLOGISCHEN DIAGNOSTIK DER ERKRANKUNG

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Walter Becker
Tierarzt aus Balhorn
Berlin 1972
Journal-Nr. 768

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Vorsitzender: Prof. Dr. J. Boch
Referent: Prof. Dr. H. Hartwigk
Korreferent: Prof. Dr. G. Monreal



Tag der Promotion: 14. Februar 1972

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung	5
2. Schrifttum	6
2.1. Allgemeines	6
2.2. Eigenschaften des Erregers	7
2.3. Wirtsspektrum	9
2.4. Klinisches Bild und Pathologie	10
2.5. Verbreitung, Übertragungsweise und Epizootologie	11
3. Eigene Untersuchungen	13
3.1. Material und Methoden	13
3.1.1. Versuchsplanung	13
3.1.2. Der Virusstamm und seine Züchtung in der Zellkultur	14
3.1.3. Reaktionspartner in der KBR	16
3.1.4. Vorversuche	21
3.1.5. Hauptversuch	22
3.1.6. Neutralisationstest (NT)	24
3.2. Ergebnisse	24
3.2.1. Seren von Meerschweinchen	24
3.2.2. Seren von Versuchspferden	27
3.2.3. Seren von Bestandspferden	29
3.2.4. Vergleich von Ergebnissen der KBR und des NT	33
4. Besprechung der Ergebnisse	36
5. Zusammenfassung	39
6. Summary	40
7. Literaturverzeichnis	41

1. Einleitung

Die virusbedingten Erkrankungen des Atmungsapparates des Pferdes haben eine große Bedeutung. Neben Influenza-, Parainfluenza 3-, Rhinopneumonitis-, Arteritis- und Adenovirus-Infektion traten in den letzten zehn Jahren vermehrt Rhinovirus-Infektionen auf (12, 13).

Das Rhinovirus equi ruft zwar in der Regel nur eine leichte respiratorische Erkrankung hervor, spielt aber als Vorläufer zahlreicher bakterieller Sekundärinfektionen eine Rolle.

Bisher war der Nachweis einer Infektion mit dem Rhinovirus equi nur durch die Virusanzüchtung in der Zellkultur oder durch den Nachweis von neutralisierenden Antikörpern im Serum möglich. Beide Verfahren haben den Nachteil, daß sie sehr zeitaufwendig sind und die Züchtung von Zellkulturen voraussetzen.

Von MOGABGAB (Zitat nach CHAPPLE (4)) sowie von CHAPPLE und HARRIS (3) wurden Antigene entwickelt, mit denen der Nachweis von gruppenspezifischen komplementbindenden Antikörpern gegen verschiedene menschliche Rhinovirusstämme gelang. Über die Durchführung einer KBR mit einem equinen Rhinovirusstamm wurde in der Literatur bislang nicht berichtet.

In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob eine KBR mit dem equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ möglich ist. Dabei galt es festzustellen, ob sich die KBR zum Nachweis einer stattgefundenen Erkrankung eignet und wie sich komplementbindende und neutralisierende Antikörper nach natürlicher und künstlicher Infektion zueinander verhalten.

2. S c h r i f t t u m

2.1. Allgemeines

Die Rhinovirusinfektion des Pferdes stellt eine Erkrankung des Atmungsapparates dar, die subklinisch verlaufen kann oder sich durch einen Katarrh der oberen Luftwege mit serösem bis mukopurulentem Nasenausfluß äußert.

In der Eigenschaft als Vorläufer verschiedener bakterieller Sekundärinfektionen liegt die eigentliche Bedeutung der Erkrankung.

Ein equines Rhinovirus wurde erstmals von PLUMMER (16) in England aus den Faeces von 13 Pferden isoliert. Er ordnete das Virus auf Grund seiner Eigenschaften der Untergruppe der Enteroviren und der Gruppe der Picornaviren zu und nannte es "equine respiratory enterovirus". Als es PLUMMER und KERRY (15) auf der Suche nach der zugehörigen Erkrankung gelang, bei mehreren Pferden durch künstliche Infektion eine Rhinitis und Pharyngitis hervorzurufen, bestand für sie kein Zweifel, daß das Virus als Erreger einer respiratorischen Erkrankung in Betracht zu ziehen war.

DITCHFIELD und MACPHERSON (6) bestätigten die Beobachtungen PLUMMERS. Sie isolierten 1962 in Kanada zwei Rhinovirustypen von Pferden mit einer respiratorischen Erkrankung. Die beiden Serotypen unterscheiden sich im Kreuzneutralisationstest und wurden erstmals als "Rhinovirus equi, Serotyp 1 bzw. Serotyp 2" bezeichnet.

WILSON (24) gelang es 1963 in Kentucky ebenfalls, ein Rhinovirus vom Pferd zu isolieren, das ebenso wie das von PLUMMER entdeckte Virus zum Serotyp 1 gehörte. 1967 isolierte BURROWS (1) in England den Rhinovirusstamm NM₁₁ von drei jungen Pferden, die an einer milden Infektion des Atmungsapparates erkrankt waren, und ordnete diesen Stamm dem Serotyp 1 zu. Serotyp 2 wurde bisher nur von DITCHFIELD und MACPHERSON in Kanada nachgewiesen.

2.2. Eigenschaften des Erregers

2.2.1. Morphologie

Die durch Filtration, Ultrazentrifugation und elektronenmikroskopische Untersuchungen ermittelte Größe des Rhinovirus equi wird mit 25 - 31 m μ angegeben (2, 14). Das Virus enthält Ribonukleinsäure und wird deshalb der Gruppe der Picornaviren zugeordnet.

Untersuchungen über die Gestalt zeigten, daß das equine Rhinovirus - ähnlich den Polioviren - eine einfache, kubische Symmetrie besitzt (6, 14). CHAPPLE und HARRIS (3) beobachteten bei menschlichen Rhinovirusstämmen im Elektronenmikroskop über den hexagonal angeordneten Begrenzungslinien noch eine "Schale", die in Untereinheiten gegliedert zu sein scheint. Außerdem unterscheiden die Autoren zwischen "leeren (hohlen)" Partikeln mit einer geringen Dichte im Caesiumchloridgradienten (1,30 g/ml) und "vollen" Partikeln mit einer höheren Dichte (1,39 - 1,41 g/ml). Diese Unterscheidung kann nach CHAPPLE und HARRIS aber nicht als ein Fehlen oder Vorhandensein von Nukleinsäure gewertet werden, denn auch in weniger dichten Fraktionen wurde virus-spezifische Nukleinsäure nachgewiesen.

Die Dichte des intakten Virions im Caesiumchloridgradienten beträgt nach BURROWS 1,40 g/ml und unterscheidet sich dadurch von der der Enteroviren mit 1,34 g/ml. Die Sedimentationskonstante in Saccharose beträgt 160 S (2).

KORANT et al. (10) bestimmten die Molekulargewichte der Polypeptide im Kapsid von menschlichen und equinen Rhinovirusstämmen. Außer einem Polypeptid mit dem Molekulargewicht 18.000 fanden sie ein zweites Polypeptid mit dem Molekulargewicht 50.000 bei einem equinen Rhinovirus, das von ihnen nicht näher klassifiziert wurde. Dieses Polypeptid ist das größte, das bisher in der Picornavirus-Gruppe nachgewiesen wurde.

2.2.2. Chemisch-physikalische Eigenschaften

Die Stabilität des Rhinovirusstammes NM₁₁ gegen Inaktivierung durch Wärme wird von BURROWS als gut bezeichnet (2). DITCHFIELD und MACPHERSON (6) geben an, daß nach Aufbewahrung des Virus über eine Stunde bei 50° C die Infektiosität von $10^{4,8} - 5,7$ KID₅₀ / 1 ml auf $10^{3,5}$ KID₅₀ / 1 ml sinkt. Im Erhaltungsmedium verliert das Virus bei Zimmertemperatur innerhalb einer Woche nur wenig an Infektiosität (14).

Eine einmolare Magnesiumchlorid-Lösung schützt das Virus im Gegensatz zum Poliovirus Typ 2 nicht vor Inaktivierung bei 50° C; durch thermisches Beugen wird das Rhinovirus in seiner Infektiosität abgeschwächt (16).

In Nasenspülproben halten sich menschliche Rhinovirusstämme bei -70° C mehrere Jahre lang, bei -40° C sinkt die Infektiosität langsam ab (23).

Das Rhinovirus ist gegen Austrocknung empfindlich; nach Gefriertrocknung in 5%igem Dextran oder 5%iger Glucose können menschliche Rhinovirusstämme jahrelang bei + 4° C aufbewahrt werden (23).

Die Säureelabilität ist ein charakteristisches Merkmal aller Rhinoviren. Im Gegensatz zu den nahe verwandten Enteroviren werden sie bei pH-Werten zwischen 2 und 5 rasch inaktiviert. Chloroform-, Äther- und Fluorocarbonbehandlung haben keinen Einfluß auf die Infektiosität des Virus (22).

DANS, FORSYTH und CHANOCK (5) stellten fest, daß nach Konzentration und Ultrazentrifugation (93.000 g über 3 Stunden) die Infektiosität zweier menschlicher Rhinovirusstämme (ECHO 28 und HGP) stark zurückging, während die komplementbindende Aktivität weitgehend erhalten blieb.

Die infektiösen Partikel der beiden Stämme hatten im Caesiumchloridgradienten eine Dichte zwischen 1,39 und 1,41 g/ml (HGP) bzw. 1,39 und 1,42 g/ml (ECHO 28). Die komplementbindende Aktivität dagegen lag in einer Fraktion mit der Dichte von 1,31 g/ml bei dem Stamm HGP und 1,30 g/ml (60%) bzw. 1,39 - 1,42 g/ml (30%) bei dem Stamm ECHO 28. Die Autoren schlossen aus diesen Ergebnissen, daß die komplementbindende Aktivität nicht an das intakte Virus, sondern an "leere Kapside oder Kapsomere" gebunden ist.

2.3. Wirtsspektrum

Im natürlichen Wirt vermehrt sich das equine Rhinovirus in der Schleimhaut des Respirationstrakts. Die aus dem Magen-Darm-Kanal isolierten Virusstämme dürften ebenfalls aus dem Respirationstrakt stammen und durch Abschlucken von Nasensekret in den Verdauungstrakt gelangt sein (16).

Für Versuchstiere ist das Rhinovirus equi nur schwach virulent. Nach intranasaler oder intraperitonealer Immunisierung von Affen, Kaninchen und Meerschweinchen lassen sich spezifische Antikörper im Serum nachweisen, und die Reisolierung des Virus gelingt aus zahlreichen Organen dieser Tiere (16).

Auch der Mensch scheint für eine Infektion empfänglich zu sein. PLUMMER (16) und DITCHFIELD (6) fanden Antikörper gegen equine Rhinovirusstämme im Serum von Stallpersonal. Die künstliche intranasale Infektion verursachte bei einem Freiwilligen eine respiratorische Erkrankung.

Im bebrüteten Hühnerei gelingt die Vermehrung des Virus nicht. Sechswöchige Küken entwickeln nach intranasaler Inokulation weder Antikörper noch läßt sich das Virus aus einem Organ reisolieren (2).

Das Rhinovirus equi vermehrt sich im Gegensatz zu den meisten menschlichen Rhinovirusstämmen, die sich nur bei 33° C in Zellstämmen von Affen oder Zellkulturen aus menschlichen Organen züchten lassen, bei 37° C in Zellkulturen, die von zahlreichen Tierspezies gewonnen werden. Es werden primäre Nierenzellkulturen vom Pferd, Affen, Kaninchen, Hund und Hamster sowie permanente Zellstämme wie LLC-MK₂, HeLa, HEP-2 und RK-13 zur Züchtung verwendet (2).

Der cytopathogene Effekt (CPE) ist durch Abkugelung, Schrumpfung des Cytoplasmas, zunehmende optische Dichte des Kerns und Ablösung des Zellrasens von der Glaswand gekennzeichnet (24). Unter einem festen Agar-Overlay können Plaques in der Zellkultur erzeugt werden (2). Einschlußkörperchen wurden bisher nicht gefunden.

2.4. Klinisches Bild und Pathologie

Die Erkrankung, die das Rhinovirus equi unter natürlichen Bedingungen hervorruft, ist durch einen milden Verlauf gekennzeichnet und läßt sich differentialdiagnostisch an Hand der Symptome von anderen virusbedingten respiratorischen Erkrankungen des Pferdes nur schwer unterscheiden (7). Der Verlauf der Krankheit hängt weitgehend von bakteriellen Sekundärinfektionen ab.

Nach einer reinen Rhinovirusinfektion zeigen die Pferde meistens nur Inappetenz, serösen Nasenausfluß, milden, feuchten Husten und eine leichte Temperaturerhöhung, die das Stadium der Virämie am Ende der ersten Krankheitswoche begleitet und durch das Auftreten neutralisierender Antikörper nach 4 - 5 Tagen abgeschlossen wird (19). Die Tiere erholen sich in der Regel innerhalb weniger Tage, ohne daß eine Behandlung notwendig wird.

Nach künstlicher Infektion beträgt die Inkubationszeit 2 - 5 Tage (15). Danach kommt es infolge eines Katarrhs der oberen Luftwege zu serösem bis mukopurulentem Nasenausfluß. Gleichzeitig bestehen eine Pharyngitis sowie Schwellung und Entzündung der pharyngealen und submaxillaren Lymphknoten (2, 19). PLUMMER und KERRY (15) fanden in den regionalen Lymphknoten Herde mit dickem gelbem Eiter und große Mengen mukopurulenten Sekrets im Pharynx und in den Luftsäcken. Sie führten diese schweren Verlaufsformen auf Sekundärinfektionen mit "diphtheroiden und coliformen" Keimen, ferner mit *Staphylococcus albus*, *Micrococcus tetragenus*, *Streptococcus viridans* und *Neisseria catarrhalis* zurück. DITCHFIELD gibt als Ursache einer schweren Verlaufsform mit regionaler Lymphadenitis und Abszedierung eine Sekundärinfektion mit *Streptococcus equi* und *Streptococcus zooepidemicus* an (8).

2.5. Verbreitung, Übertragungsweise und Epizootologie

Durch virologische und serologische Untersuchungen konnte die Erkrankung bisher in Nordamerika (6, 20, 24), Afrika (2), auf den britischen Inseln (2, 15) und auf dem westeuropäischen Kontinent (19) nachgewiesen werden, die Verbreitung des Rhinovirus equi dürfte aber weltweit sein.

Die Übertragungsweise der equinen Rhinoviren ist bisher noch nicht näher untersucht worden. Sie dürfte in gleicher Weise erfolgen wie bei anderen respiratorischen Erkrankungen des Pferdes. Außer der direkten Tröpfcheninfektion durch virushaltiges Nasensekret kommt dem Stallpersonal und den Stallgeräten als Vektoren eine Bedeutung zu.

Die Infektion nimmt von subklinisch und klinisch erkrankten Pferden ihren Ausgang. Eine besondere Bedeutung für die Ausbreitung der Erkrankung wird rekonvaleszenten Tieren beigemessen, da das Virus trotz Auftretens neutralisierender

Antikörper im Serum in der Pharynxschleimhaut über mehrere Wochen persistieren kann und durch Nasensekret und Kot ausgeschieden wird (2).

Die Ansteckung erfolgt hauptsächlich während der Turniersaison, wenn zahlreiche Pferde aus verschiedenen Beständen zusammenkommen. BURROWS (2) und DITCHFIELD (6) stellten fest, daß sich im Serum von Turnierpferden zu einem wesentlich höheren Prozentsatz (60 - 97%) neutralisierende Antikörper nachweisen lassen als bei Pferden, die in landwirtschaftlichen Betrieben in relativer Isolation gehalten werden (nur 30%).

Im Gegensatz dazu fanden TEUFEL und KELLER (19) in Serumproben aus einem Bestand mit Kaltblutpferden, die selten mit anderen Pferden zusammenkamen, die gleichen hohen Titer gegen den equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ wie in Proben, die in Reitställen mit häufigem Pferdewechsel genommen wurden.

Über die Verteilung neutralisierender Antikörper im Serum von Pferden verschiedener Altersgruppen liegen Untersuchungen von DITCHFIELD und MACPHERSON (6) sowie von TEUFEL und KELLER (19) vor. Erstere geben an, daß Fohlen unter einem halben Jahr serologisch negativ sind und sich die meisten Pferde bis zum zweiten Lebensjahr anstecken. Bei 90% der Fünfjährigen lassen sich spezifische Antikörper im Serum nachweisen. TEUFEL und KELLER teilen die untersuchten Pferde in zwei Altersgruppen ein. In der Gruppe 1 (2 - 6 Jahre) haben 76% der Pferde Titer zwischen 1:256 und 1:4.096. Bei Pferden über 6 Jahre (Gruppe 2) kommen hingegen keine negativen Seren mehr vor.

Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß die Rhinovirusinfektion eine Jungtiererkrankung darstellt. Junge und serologisch negative Pferde bilden innerhalb von 2 - 4 Wochen, nachdem sie in einen infizierten Bestand verbracht worden sind, spezifische Antikörper gegen das equine Rhinovirus aus (2, 19).

Über die Beziehungen zwischen Antikörperspiegel und Schutz vor der Erkrankung liegen keine Untersuchungen vor.

BURROWS (2) ist aber der Meinung, daß die Verhältnisse ähnlich seien wie bei anderen Picornaviren. Ein Neutralisationstiter von 1:32 verhindert bei 50% der mit dem MKS-Virus infizierten Rinder und Schweine das Stadium der Virämie und das Auftreten von Folgeerscheinungen. Bei 50% der Freiwilligen, die sich mit dem menschlichen Rhinovirusstamm Typ 13 infizieren ließen und zuvor ebenfalls einen Titer von 1:32 hatten, kam es nicht zu einer respiratorischen Erkrankung.

3. Eigene Untersuchungen

3.1. Material und Methoden

3.1.1. Versuchsplanung

Es war geplant, zunächst die Eignung unbehandelter virus-haltiger Zellkulturflüssigkeit als komplementbindendes Antigen gegen Meerschweinchen-Immunseren zu ermitteln. Danach sollte geprüft werden, ob mit konzentrierten Antigenen höhere Titer gegen den equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ zu erreichen sind.

Mit den gleichen Antigenen sollte dann eine KBR unter Verwendung von Seren zweier Versuchspferde, die mit dem Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - infiziert worden waren, durchgeführt werden, um zu ermitteln, ob komplementbindende Antikörper gegen das Virus in Pferdeseren vorhanden und nachweisbar sind.

Danach sollten Einzelseren und Serumpaare von Pferden aus Berliner Reitställen auf Vorhandensein komplementbindender Antikörper hin überprüft werden. Außerdem war die Frage zu klären, inwieweit ein Antikörperanstieg in der KBR mit einem Anstieg im Neutralisationstest (NT) einhergeht und ob eine Beziehung zwischen der Titerhöhe komplementbindender und neutralisierender Antikörper besteht.

3.1.2. Der Virusstamm und seine Züchtung in der Zellkultur

Der equine Rhinovirusstamm NM₁₁^{x)} wurde in dem permanenten Rhesusaffennieren-Zellstamm LLC-MK₂ und in Zellkulturen des HeLa-Zellstammes gezüchtet.

x) Für die Überlassung dieses Stammes danke ich Herrn Prof. Dr. Burrows, Animal Virus Research Institute, Pirbright, England herzlichst.

Die Vermehrung beider Zellstämme erfolgte in Rouxflaschen nach dem folgenden Verfahren: Nach Abgießen des Erhaltungsmediums wurden die Zellen mit kalzium- und magnesiumfreiem Trypsin von der Glaswand abgelöst und im Verhältnis 1:3 in Anzuchtmedium aufgenommen. Die Aussaat der Zellsuspension in die Kulturgefäße schloß sich an. Als Kulturgefäße dienten wieder Rouxflaschen (100 ml Zellsuspension) oder Reagenzröhrchen (1,5 ml Zellsuspension). Nach 3 - 5tägiger stationärer Bebrütung bei 37° C entwickelte sich ein dichter Zellrasen.

Als Anzuchtmedium diente eine HANKS-Laktalbumin(0,5%)-Hefeextrakt(0,1%)-Lösung mit 10% Kälberserum und dem Zusatz von 100 IE Penicillin G und 100 µg Streptomycinsulfat pro 1 ml Medium. Das Erhaltungsmedium war das gleiche wie das Anzuchtmedium, enthielt aber nur 2% Kälberserum.

In den Fällen, in denen das Virus zur Antigenherstellung oder zur Immunisierung von Versuchstieren verwendet werden sollte, wurde das genannte Erhaltungsmedium durch ein kälberserumfreies, synthetisches Medium (L-15-Medium der Fa. Flow-Laboratories, Glasgow, Schottland) ersetzt. Über das Erhaltungsmedium erfolgte auch die Beimpfung der in Rouxflaschen gezüchteten Zellkulturen mit 1 ml Virussuspension einer vorangegangenen Kulturpassage pro 100 ml Medium.

Der cytopathogene Effekt (CPE) des equinen Rhinovirusstammes NM₁₁ äußerte sich als typischer Abkugelungseffekt und entwickelte sich in Zellkulturen des LLC-MK₂- und HeLa-Zellstammes in der gleichen Weise. Bei hoher Animpfdosis waren 24 Stunden post infectionem (p.i.) 50 - 60% der Zellen abgekugelt und 10 - 15% bereits von der Glaswand abgelöst. Nach weiteren 24 Stunden waren die degenerativen Veränderungen des Zellrasens so weit fortgeschritten, daß nur noch vereinzelt Zellnester an der Glaswand hafteten.

Das in LLC-MK₂-Zellen gezüchtete Virusmaterial diente der Antigenherstellung für die KBR und befand sich in der 11. Kulturpassage. Das in HeLa-Zellen vermehrte Virusmaterial fand zur Immunisierung der Meerschweinchen und der Versuchspferde Verwendung. Es handelte sich um die 7. Kulturpassage.

3.1.3. Reaktionspartner in der KBR

Die Durchführung der KBR erfolgte im Mikrotitersystem der Fa. Cooke Engineering nach einer von TAKATSY und SEVER (18) modifizierten KOLMER-Technik. In diesem System werden alle Reaktionspartner in Mengen von 0,025 ml oder einem Vielfachen davon verwendet.

3.1.3.1. Veronalpuffer

Zur Verdünnung der Seren, des Komplements und des Antigens sowie zur Herstellung des hämolytischen Systems wurde eine gelatinehaltige Veronalpufferlösung nach MAYER, OSLER, BIER und HEIDELBERGER (11) mit folgender Zusammensetzung verwendet:

Lösung A (Stammlösung):

aqua bidest.	1.000 ml
NaHCO ₃	1,26 g
5,5-Diäthylbarbitursäure (heiß lösen)	2,3 g
NaCl	41,65 g
Barbital-Barbital-Natrium	1,5 g
MgCl ₂	0,5 g
CaCl ₂	0,1 g

Die Lösung A wird 30 Minuten lang autoklaviert oder durch EKS I steril filtriert und bei 4° C aufbewahrt.

Lösung B:

aqua bidest.	4.000 ml
Gelatine	5,0 g

Lösung B wird 30 Minuten lang im Dampftopf erhitzt und bei Zimmertemperatur aufbewahrt.

Die fertige Veronalpufferlösung setzt sich aus einem Teil der Lösung A und vier Teilen der Lösung B zusammen.

3.1.3.2. Antigene

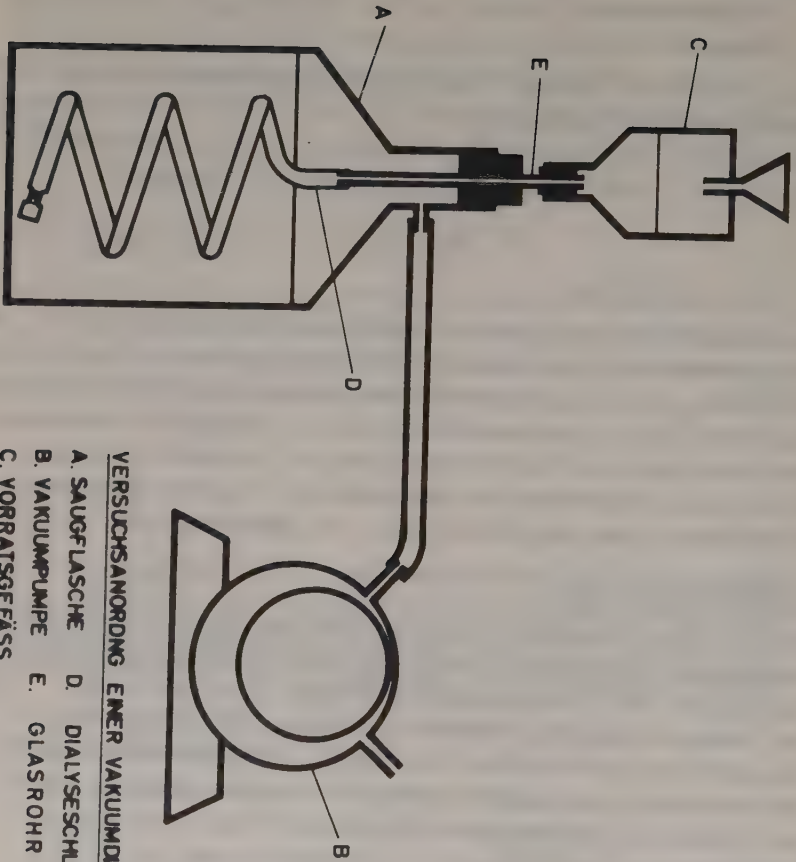
In Vorversuchen fand die 11. LLC-MK₂-Kulturpassage des Virusstammes NM₁₁ mit einem Infektiositätstiter von $10^{7,0}$ KID₅₀ / 1 ml als KBR-Antigen Verwendung. Damit konnten jedoch keine komplementbindenden Antikörper in Antiseren von Meerschweinchen nachgewiesen werden. Deshalb wurde versucht, durch Konzentration des Virus ein besseres KBR-Antigen zu gewinnen. Zwei Verfahren kamen zur Anwendung:

Methanolfällung (21)

Sieben Teile virushaltige Zellkulturflüssigkeit wurden nach dreimaligem thermischen Beugen und Zentrifugation mit drei Teilen auf -24° C vorgekühltem Methanol (Methanol p.A. Fa. Merck, Darmstadt) versetzt und nach 24stündiger Reaktionszeit bei 3.000 U/Min. 15 Minuten lang zentrifugiert. Der Bodensatz stellte das ausgefällte Antigen dar und wurde in 1/30 des Ausgangsvolumens VM₃-Medium ohne Laktalbuminhydrolysat (17) aufgenommen, resuspendiert und bei -24° C gelagert.

Vakuumdialyse

Die Vakuumdialyse-Einrichtung (siehe Abbildung S. 18) besteht aus einer 10-Liter-Saugflasche (a), die an eine Vakuumpumpe (b) angeschlossen ist, einem Vorratsgefäß für die zu dialysierende Flüssigkeit (c) und dem ca. 1,50 m langen Dialyseschlauch (d) ($\varnothing$ 7 mm $\times$ 10 mm, Typ 8/32 Visking, Vertrieb: Fa. Serva, Heidelberg). Letzterer ist durch ein Glasrohr (e) mit dem Vorratsgefäß verbunden.



VERSUCHSANORDNUNG EINER VAKUUMDIALYSE

- | | |
|-----------------|--------------------|
| A. SAUGFLASCHE | D. DIALYSESCHLAUCH |
| B. VAKUUMPUMPE | E. GLASROHR |
| C. VORRATSGEFÄß | |

In die Saugflasche werden 10 Liter Veronalpuffer ^{x)} eingefüllt. Nach Anlegen eines Vakuums in der Saugflasche kommt es durch den höheren Druck in Dialyseschlauch und Vorratsgefäß zum Abpressen von Flüssigkeit und somit zur Konzentration derjenigen Moleküle, für die der Dialyseschlauch nicht durchlässig ist.

In dem beschriebenen System wurde die virushaltige Zellkulturflüssigkeit nach Zentrifugation über 30 Min. bei 4.500 U/Min. gegen Veronalpuffer vakuumdialysiert und so innerhalb von 6 - 8 Stunden von 600 ml auf etwa 20 ml eingengt.

Kontrollantigen

Je eine Rouxflasche mit dichtem LLC-MK₂-Zellrasen wurde mit 20 ml VM₃-Medium beschickt; die Zellen wurden durch thermisches Beugen (dreimaliges Einfrieren bei -24° C und Wiederauftauen bei Zimmertemperatur) zerstört und die groben Zelltrümmer durch niedertourige Zentrifugation abgetrennt. Der Überstand stellte das Kontrollantigen dar.

Die durch Methanolfällung und Vakuumdialyse gewonnenen Antigene mußten zur Ermittlung der optimalen Verdünnung im Schachbrettversuch gegen ein positives Serum ausgetestet werden. Als Kontrolle diente das LLC-MK₂-Kontrollantigen.

x) Die Veronalpuffer-Stammlösung ist für die Vakuumdialyse mit aqua bidest. ohne Gelatinezusatz 1:5 verdünnt worden.

3.1.3.3. Komplement und hämolytisches System

Als Komplement wurde Meerschweinchenserum von instituts-eigenen Tieren verwendet, das maximal acht Wochen bei -24°C gelagert wurde.

Das hämolytische System bestand zu gleichen Teilen aus dem 1:1.000 verdünnten "Anti-Sheep-Hemolysin" der Fa. Behringwerke AG (Bestell-Nr. ORLB 24/25) und einer 2%igen Hammelerythrozyten-Suspension.

3.1.3.4. Seren

Um für die Entwicklung der KBR mehrere Seren mit möglichst hohen Titern gegen den Virusstamm NM_{11} zu gewinnen, wurden vier Meerschweinchen dreimal in wöchentlichem Abstand mit 5 ml einer 7. HeLa-Kulturpassage des Virusstammes NM_{11} (Infektiosität: $10^{6,5} \text{ KID}_{50} / 1 \text{ ml}$) intraperitoneal infiziert und zwei Wochen nach der letzten Infektion entblutet. Die Serumproben wurden durch Zentrifugation geklärt und bei -24°C gelagert.

Zwei Versuchspferde aus der Klinik für Pferdekrankheiten - eine 3jährige Traberrappstute und ein 5jähriger Traberwallach - wurden mit der chloroformbehandelten 7. HeLa-Kulturpassage des Rhinovirusstammes NM_{11} infiziert.

Zu Beginn wurden der Stute je 5 ml der Virussuspension in jede Nasehöhle versprüht und dem Wallach 10 ml intramuskulär verabreicht. Eine Woche später erhielten beide Pferde je 10 ml des gleichen Virusmaterials intramuskulär.

Von beiden Pferden wurden nach der ersten Infektion in zweitägigem und nach der zweiten Infektion in wöchentlichem Abstand über vier (Wallach) bzw. fünf (Stute) Monate Blutproben entnommen.

Außerdem kamen Pferdeseren aus verschiedenen Berliner Pferdebeständen in der KBR zur Untersuchung.

Die Lagerung der Pferdeseren erfolgte ebenfalls bei -24°C .

3.1.4. Vorversuche

3.1.4.1. Ermittlung der Infektiositätstiter

Zur Ermittlung der mittleren Infektiositätstiter (KID_{50}) der jeweiligen Passagen sind die Virussuspensionen in Zehnerpotenzen mit Erhaltungsmedium verdünnt und in Mengen von 0,1 ml auf je 4 LLC-MK₂-Röhrchen pro Verdünnungsstufe verimpft worden.

Der Titrationsendpunkt wurde auf Grund des cytopathogenen Effektes (CPE) in den Zellkulturröhrchen nach 6tägiger stationärer Bebrütung bei 37° C ermittelt. Die Berechnung der Infektiositätstiter erfolgte nach der Methode von KÄRBER (9) und ergab für die 11. LLC-MK₂-Kulturpassage des Virusstammes NM₁₁ einen Titer von $10^{7,0} KID_{50} / 1 \text{ ml}$ und für die 7. HeLa-Kulturpassage einen Titer von $10^{6,5} KID_{50} / 1 \text{ ml}$.

3.1.4.2. Komplementauswertung

Zur Bestimmung der Komplementgebrauchsverdünnung mußte vor jeder KBR eine Komplementauswertung in Anwesenheit von Antigen und negativem Serum durchgeführt werden. Die Verdünnung des Komplements erfolgte in 0,5%igen Abständen von 0,5 bis 5,0%.

Zu 0,025 ml dieser Verdünnungen wurden die gleichen Volumina negatives Serum und Antigen sowie 0,050 ml hämolytisches System getropft und bei 37° C 30 Minuten lang im Brutschrank inkubiert. Als eine Komplementeinheit (1 KE) wurde die niedrigste Komplementverdünnungsstufe definiert, bei der vollständige Hämolyse eingetreten war. Als Arbeitsdosis wurde eine Komplementverdünnung mit 1,5 KE verwendet, die 30 Minuten vor dem Eintropfen hergestellt und bis zur Verwendung im Eiswasserbad aufbewahrt wurde.

3.1.4.3. Antigenauswertung

Die Antigene (virushaltige Zellkulturflüssigkeit, methanol-gefälltes und vakuumdialysiertes Virusantigen sowie LLC-MK₂-Kontrollantigen) wurden im Schachbrettversuch in Zweierpotenzen bis 1:32 verdünnt und gegen ein positives und ein negatives Meerschweinchenserum in steigenden Verdünnungen ausgetestet. Im Hauptversuch fand diejenige Antigenverdünnung als KBR-Antigen Verwendung, mit der bei dem positiven Serum der höchste Titer in der Auswertung erreicht worden war und das negative Serum in allen Verdünnungen vollständige Hämolyse zeigte.

3.1.5. Hauptversuch

Nach Vorlage von 0,025 ml Veronalpuffer in alle Vertiefungen einer Titrierplatte wurden die Serumproben eingebracht, verdünnt (1:2 bis 1:256), Komplement und Antigen (je 0,025 ml) hinzugegeben und durch vorsichtiges Schütteln der Platte mit den Serumverdünnungen gemischt. Nach 16 - 18stündiger Bindungszeit bei +4° C und anschließendem Vorwärmen im Brutschrank erfolgte das Eintropfen des ebenfalls vorgewärmten hämolytischen Systems (0,050 ml). Die Inkubationszeit betrug 30 Minuten bei 37° C. Nach 2stündigem Stehenlassen bei Zimmertemperatur wurden die Ergebnisse abgelesen. Dabei lagen folgende Bewertungsmaßstäbe zu Grunde:

4+ = 100%ige Hämolysehemmung

Der Überstand ist klar; nicht gelöste Erythrozyten sind als kompakter Knopf am Boden der Vertiefung sichtbar.

3+ = 75%ige Hämolysehemmung

Der Überstand ist leicht rot gefärbt; am Boden bildet sich ein deutlicher Knopf nicht lysierter Erythrozyten.

- 2+ = 50%ige Hämolysehemmung
Der Überstand ist transparent rot gefärbt; nicht gelöste Erythrozyten bilden noch einen deutlichen Knopf am Boden der Vertiefung.
- 1+ = 25%ige Hämolysehemmung
Der Überstand ist intensiv rot gefärbt; am Boden der Vertiefung ist nur noch ein Schleier ungelöster Erythrozyten sichtbar.
- 0 = vollständige Hämolyse
Der Überstand ist transparent dunkelrot gefärbt; es ist kein Bodensatz vorhanden.

Als Endtiter galt diejenige Serumverdünnung, die noch eine 50%ige Hämolysehemmung aufwies.

Zu jeder KBR wurden parallel zum Hauptversuch folgende Kontrollen angesetzt:

1. Serumkontrolle
Der Ansatz der Serumkontrolle aller ausgetesteten Seren verlief genauso wie im Hauptversuch, lediglich das Virusantigen wurde durch Veronalpuffer ersetzt.
2. Antigenkontrolle
Statt der Seren wurde bei dieser Kontrolle Veronalpuffer eingetropft.
3. Komplementkontrollen
Das Serum wurde durch Veronalpuffer und die Komplementgebrauchsverdünnung mit 1,5 KE durch Komplementverdünnungen mit 3,0; 1,5; 1,0; 0,75; 0,5 und 0 KE ersetzt.
4. Pufferkontrolle
Hier wurden 0,075 ml Veronalpuffer und 0,050 ml hämolytisches System eingetropft.
5. Nach Etablierung der KBR wurde zu jedem Hauptversuch jeweils ein positives und ein negatives Serum mit Virusantigen und Veronalpuffer austitriert. Diese Kontrollergebnisse mußten mit vorangegangenen Titrationsergebnissen übereinstimmen.

3.1.6. Neutralisationstest (NT)

Für den Nachweis spezifischer, neutralisierender Antikörper gegen den equinen Rhinovirusstamm NM₁₁ in Meerschweinchen-Immunseren und Pferdeseren wurde der Neutralisationstest (Serumverdünnungsmethode) herangezogen.

Zu den in Zweierpotenzen mit Erhaltungsmedium verdünnten Seren wurde das gleiche Volumen einer Virussuspension mit 100 KID₅₀ / 0,1 ml gegeben und dieses Gemisch nach einstündiger Inkubationszeit bei 37° C im Wasserbad ab einer Verdünnungsstufe von 1:4 auf 4 LLC-MK₂ Zellkulturröhrchen pro Verdünnung in 0,2 ml-Mengen verimpft.

Die Bebrütung erfolgte stationär bei 37° C. Nach 4 bis 5 Tagen konnten die Titrationen abgelesen und die Titer nach der Methode von KÄRBER (9) berechnet werden.

Die Signifikanzschwelle D betrug in diesem System 2,1 log₂.

3.2. Ergebnisse

3.2.1. Seren von Meerschweinchen

Die KBR mit dem equinen Rhinovirus NM₁₁ sollte zunächst mit Meerschweinchenseren versucht werden. Deshalb wurden vier Meerschweinchen mit einer 7. HeLa-Zellkultur-Passage des Virusstammes NM₁₁ immunisiert und die Seren gewonnen.

Als Ausgangsmaterial für die KBR-Antigene fand die 11. LLC-MK₂-Zellkultur-Passage Verwendung, um auszuschließen, daß die eventuell auftretenden positiven Reaktionen durch Antikörper gegen das Zelleiweiß der HeLa-Zellen hervorgerufen wurden.

Die KBR ist als Schachbrettversuch in der Weise durchgeführt worden, daß steigende Serumverdünnungen (1:2 bis 1:256) gegen steigende Antigenverdünnungen (unverdünnt bis 1:32) aus- titriert wurden. Als Antigene fanden unbehandeltes, virus- haltiges Zellkulturmedium (Virusantigen 1), methanolgefälltes

Virus (Virusantigen 2) und vakuumdialysiertes Virus (Virusantigen 3) Verwendung. Als Kontrollantigen diente LLC-MK₂-Zellkultur-Antigen und als Serumkontrolle ein gepooltes Serum nicht immunisierter Meerschweinchen.

Die Ergebnisse des Schachbrettversuchs sind in Tabelle 1 eingetragen.

Tabelle 1: KBR mit dem Meerschweinchen-Immunserum Nr. 1 gegen steigende Verdünnungen verschiedener Antigenaufbereitungen des Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁

KBR-Titer des Meerschweinchenserums Nr. 1 gegen folgende Antigenverdünnungen:						
verwendetes Antigen	unver- dünnt	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
Virusantigen 1	1:16	1:8	1:4	1:2	1:2	1:2
Virusantigen 2	1:32	1:32	1:16	1:4	1:4	1:4
Virusantigen 3	1:32	1:32	1:64	1:32	1:16	1:8
Zellkultur- Kontrollantigen	-	-	-	-	-	-
Veronalpuffer	-	-	-	-	-	-

Wie aus dem Versuch hervorgeht, wurden nach Immunisierung von Meerschweinchen komplementbindende Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - gebildet. Der dabei ermittelte Titer war in hohem Maße von der Wahl des Antigens abhängig.

Mit unbehandeltem virushaltigem Zellkulturmedium (Virusantigen 1) ließ sich nur mit unverdünntem Antigen ein Titer von 1:16 erreichen. Mit steigender Verdünnung des Antigens sanken auch die ermittelten Antikörpertiter des Serums.

Bei Verwendung von konzentriertem und 1:2 verdünntem methanolgefälltem Antigen (Virusantigen 2) konnte ein komplementbindender Antikörpertiter von 1:32 nachgewiesen werden, aber auch bei diesem Antigen sanken die Titer bei weiterer Verdünnung rasch ab.

Das beste KBR-Antigen stellte offenbar das vakuumdialysierte Virusantigen 3 dar, denn mit diesem ließen sich selbst bei steigenden Antigenverdünnungen noch höhere Antikörpertiter nachweisen, als es bei Verwendung der anderen Antigene möglich war. Die Antigenverdünnung von 1:4 war als optimale Konzentration anzusehen, denn bei dieser Verdünnung lag ein eindeutiges Reaktionsoptimum.

Mehrfache Wiederholungen des Schachbrettversuchs sowie Titrationen mit den drei Meerschweinchen-Immunseren Nr. 2, 3 und 4 ergaben stets dasselbe Bild. Das 1:4 verdünnte vakuumdialysierte Antigen stellte sich immer als das beste KBR-Antigen dar. Die ermittelten Titer komplementbindender Antikörper betrugen bei diesen drei Meerschweinchen-Immunseren 1:128.

Im Neutralisationstest (NT) wurden die Titer der neutralisierenden Antikörper im Serum der vier immunisierten Meerschweinchen bestimmt. Sie lagen für die Seren Nr. 2 und 4 bei 1:128, für das Serum Nr. 1 bei 1:181 und für das Serum Nr. 3 bei 1:256.

Die Ergebnisse des Schachbrettversuchs stellten die Grundlage für alle weiteren Untersuchungen dar. Durch diesen Versuch wurde gezeigt, daß nach Immunisierung von Meer-

schweinchen mit dem Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - komplementbindende und neutralisierende Antikörper gebildet werden und es möglich ist, die KBR unter Verwendung eines geeigneten Antigens zum Nachweis dieser Antikörper zu verwenden.

3.2.2. Seren von Versuchspferden

Als nächstes sollte geprüft werden, ob die beiden Versuchspferde, die mit dem Rhinovirusstamm NM₁₁ infiziert worden waren, komplementbindende Antikörper ausbildeten. Vor der Infektion hatten beide Tiere einen Titer spezifischer komplementbindender Antikörper von 1:8 und Neutralisationstiter von 1:256 (Stute) und 1:1.024 (Wallach) gegen das Rhinovirus equi 1.

Einige Serumproben der Versuchspferde wurden außer in der KBR auch im Neutralisationstest (NT) auf spezifische Antikörper hin untersucht. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 2 zusammengefaßt. Neben den KBR- und NT-Titern sind die jeweiligen negativen $\log_2$ -Werte dieser Titer eingetragen. Die Signifikanzschwelle D eines Titers zu dem nächsthöheren bzw. -niedrigeren Titer beträgt 2,1, d.h. daß ein Titeranstieg bzw. -abfall erst dann als signifikant angesehen werden darf, wenn die Differenz der Zweierpotenzen eines Serumpaares mehr als 2,1 beträgt.

Tabelle 2:

Entwicklung komplementbindender und neutralisierender
Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ -
im Serum von zwei Versuchspferden

Wochen p.i.	Stute				Wallach			
	KBR		SNT		KBR		SNT	
	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$	$\log_2$
0	1:8	3,0	1:256	8,00	1:8	3,0	1:1.024	10,00
1	1:8	3,0	1:1.216	10,25	1:16	4,0	1:1.722	10,75
3	1:32	5,0	1:2.048	11,00	1:64	6,0	1:5.794	12,50
4	1:32	5,0	1:2.897	11,50	1:64	6,0	1:4.864	12,25
5	1:32	5,0	1:5.794	12,50	1:64	6,0	1:6.887	12,75
8	1:32	5,0	1:4.864	12,25	1:64	6,0	1:5.794	12,50
11	1:32	5,0	1:4.864	12,25	1:64	6,0	1:2.897	11,50
14	1:32	5,0	1:2.897	11,50	1:64	6,0	1:3.449	11,75
18	1:32	5,0	1:4.864	12,25	1:64	6,0	1:4.864	12,25

Als Bezugspunkt für die Zeitangabe "Wochen p.i." gilt der Tag der Erstinfektion
(Woche 0).

Die Stute zeigte eine Woche nach der intranasalen Infektion einen Anstieg neutralisierender Antikörper von 1:256 auf 1:1.216, während die komplementbindenden Antikörper mit einem Titer von 1:8 auf gleicher Höhe blieben. Eine intramuskuläre Boosterinjektion eine Woche nach der intranasalen Inokulation (1 Woche p.i.) bewirkte, daß die KBR-Titer in der dritten Versuchswoche von 1:8 auf 1:32 anstiegen, während die neutralisierenden Antikörper zwar auch signifikant auf 1:2.048 anstiegen, ihren Höhepunkt mit einem Titer von 1:5.794 aber erst in der fünften Woche erreichten.

Bei dem Wallach stiegen die komplementbindenden Antikörper nach einer Woche von 1:8 auf 1:16 an. Dieser Anstieg wurde in Mehrfachbestimmungen bestätigt. Der Neutralisationstiter lag eine Woche p.i. mit einem Wert von 1:1.722 noch innerhalb des Vertrauensbereiches des anfänglichen Titers von 1:1.024. Die zweite intramuskuläre Injektion bewirkte nach zwei Wochen eine Zunahme der komplementbindenden Antikörper von 1:16 auf 1:64 und der neutralisierenden Antikörper von 1:1.722 auf 1:5.794. Dieser Wert stellte den Höhepunkt dar.

Bis zum Ende der Versuche änderten sich bei beiden Pferden die Spiegel der komplementbindenden Antikörper von 1:32 bzw. 1:64 ebensowenig wie die der Neutralisationstiter, die sich nicht über die Signifikanzschwelle von $D=2,1 \log_2$ der höchsten Werte bewegten.

3.2.3. Seren von Bestandspferden

Der vorhergehende Versuch zeigte, daß Pferde nach Immunisierung mit dem equinen Rhinovirus 1 - Stamm NM₁₁ - komplementbindende Antikörper ausbilden und diese in der KBR auch erfaßt werden konnten. Weiter sollte geprüft werden, inwieweit die KBR für Bestandsuntersuchungen und für den serologischen Nachweis einer überstandenen Erkrankung geeignet ist.

Insgesamt gelangten 247 Serumproben von 105 Pferden aus 8 Berliner Pferdebeständen zur Untersuchung in der KBR. Von 46 Pferden war nur eine Probe vorhanden, von 59 Pferden lagen 2 bis 9 Proben vor (vergl. Tabelle 3). Der zeitliche Abstand zwischen den einzelnen Probenentnahmen betrug 1 bis 17 Monate.

Tabelle 3:

Anzahl der Proben: n =	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Anzahl der Pferde: x =	46	14	28	9	2	2	1	2	1

Über die Verteilung der Titerhöhen der 105 untersuchten Pferde gibt Tabelle 4 Aufschluß. Von jedem Pferd wurde der höchste der ermittelten Titer berücksichtigt.

Tabelle 4:

ermittelter Titer:	<1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Anzahl der Pferde: x =	13	4	29	21	15	19	4

Nur 13 der 105 untersuchten Pferde (12,4%) hatten keine komplementbindenden Antikörper gegen das equine Rhinovirus 1 ausgebildet. Ihnen standen 92 Pferde (87,6%) mit Titern zwischen 1:2 und 1:64 gegenüber.

Das Verhältnis KBR-positiver und -negativer Pferde änderte sich auch dann nicht wesentlich, wenn man erst Titer ab 1:4 als signifikant ansah, weil nur 4 Pferde Antikörpertiter von 1:2 aufweisen. Die überwiegende Mehrzahl der Pferde (80%) enthielt im Serum komplementbindende Antikörper mit Titern zwischen 1:4 und 1:32. In 4 Serumproben konnten hohe Spiegel komplementbindender Antikörper mit Titern von 1:64 nachgewiesen werden.

Bei 59 Pferden, von denen mehrere Serumproben untersucht worden sind, zeigten 29 Tiere absolut gleichbleibende Titer. über einen Zeitraum von einem Monat bis einem Jahr. Über die Höhe dieser Titer gibt Tabelle 5 Aufschluß.

Tabelle 5:

ermittelte Titer:	<1:2	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
Anzahl der Serumpaare:	3	0	1	9	6	8	2
Ø Zeitraum in Monaten:	2,3	-	5	1,8	3,9	4	8

Die meisten Pferde (23 von 29) mit gleichbleibendem Antikörperspiegel hatten Titer von 1:8 bis 1:32. Konstante Titer von 1:2 kamen nicht vor, ein Titer von 1:4 wurde nur einmal festgestellt. Im Bereich bis 1:4 lag jedoch die Mehrzahl derjenigen Proben, deren Antikörperspiegel nur um eine Zweierpotenz schwankte.

Hohe gleichbleibende Titer von 1:64, die aber über einen Beobachtungszeitraum von 4 bis 12 Monaten (Ø 8 Monate) konstant blieben, wurden nur von 2 Pferden erreicht.

Betrachtete man eine Titterschwankung von einer Zweierpotenz als nicht signifikant, so erhöhte sich die Zahl der Pferde mit gleichbleibendem Titer auf 43.

Bei 30 von 59 Pferden konnten Titterschwankungen in einem Zeitraum von 1 bis 17 Monaten beobachtet werden. Serumpaare, deren Titer sich nur um eine Zweierpotenz unterschieden, wurden bereits als gleichbleibend angesehen.

Eine Übersicht über die Anzahl der Pferde, deren Titer komplementbindender Antikörper um mehr als eine Zweierpotenz anstieg, gibt Tabelle 6.

Tabelle 6:

Anstieg um n Zweierpotenzen: n =	2	3	4	5
Anzahl der Pferde:	x = 10	2	2	2

10 Pferde zeigten Titeranstiege um 2 Zweierpotenzen und je 2 Pferde Anstiege um 3, 4 und 5 Potenzen.

Während ein Ansteigen von komplementbindenden Antikörpertitern bei insgesamt 16 Pferden beobachtet werden konnte, sanken die Titer von nur 3 Pferden 9 Monate nach Erreichen des Gipfels wieder um 2 Zweierpotenzen ab.

Von den 8 untersuchten Beständen soll auf einen Bestand besonders eingegangen werden, da in diesem Stall eine respiratorische Erkrankung klinisch diagnostiziert wurde. Von 10 Pferden dieses Bestandes erkrankten 6 Tiere im Verlauf von 20 Tagen. Bei 3 Pferden war es möglich, Serumproben in der akuten Krankheitsphase zu gewinnen, während die übrigen 3 Tiere die Erkrankung bereits 1 bis 2 Wochen zuvor durchgemacht hatten.

Die ersten Serumproben der 3 akut erkrankten Tiere enthielten komplementbindende Antikörper mit Titern von $<1:2$, $1:2$ und $1:4$ und stiegen im Verlauf von 2,5 Monaten auf $1:32$ (2 Pferde) bzw. $1:64$ (1 Pferd) an.

Der Neutralisationstest mit den gleichen Serumpaaren ergab ebenfalls einen Anstieg der neutralisierenden Antikörper von <1:4 bei allen 3 Pferden auf 1:128, 1:181 und 1:256.

Die zuvor erkrankten 3 Tiere und die 4 nicht erkrankten Pferde wiesen komplementbindende Antikörper mit Titern zwischen 1:8 und 1:32 auf.

3.2.4. Vergleich von Ergebnissen der Komplementbindungsreaktion (KBR) und des Neutralisationstests (NT)

Zur Überprüfung einer Beziehung zwischen der Titerhöhe komplementbindender und neutralisierender Antikörper wurden die in der KBR ermittelten Titer von 34 Serumproben im Neutralisationstest überprüft. Die Seren wurde so ausgewählt, daß je 10 Proben einen Titer komplementbindender Antikörper von <1:2, 1:4 und 1:16 und 4 Proben einen Titer von 1:64 hatten. Die Ergebnisse sind in Tabelle 7 dargestellt.

Tabelle 7: Gegenüberstellung von KBR- und NT-Titern

KBR-Titer	<1:2	1:4	1:16	1:64
	<1:4	1:1.024	1:4.096	1:8.192
	1:368	1:2.048	1:284	1:8.192
	1:315	1:315	1:2.388	1:5.801
	1:284	1:1.261	1:2.048	1:8.192
NT-Titer	<1:4	1:2.521	1:2.048	
	<1:4	1:4.096	1:725	
	<1:4	1:284	1:2.048	
	<1:4	1:79	1:512	
	<1:4	1:630	1:362	
	<1:4	1:1.738	1:512	
Ø NT-Titer	1:96	1:1.389	1:1.506	1:7.594

Von 10 Pferden, in deren Seren keine komplementbindenden Antikörper nachzuweisen waren, waren 7 Tiere auch im Neutralisationstest negativ ($<1:4$). Die Titer der neutralisierenden Antikörper der 3 anderen Pferde betrugen $1:368$, $1:315$ und $1:284$. Das arithmetische Mittel der Titer für alle 10 Pferde lag bei $1:96$.

Die Gruppe der Serumproben mit KBR-Titern von $1:4$ und $1:16$ unterschied sich im Durchschnittstiter der neutralisierenden Antikörper wenig. Hier standen sich Werte von $1:1.389$ (KBR $1:4$) und $1:1.506$ (KBR $1:16$) gegenüber. Die Titer der Einzelproben schwankten im Neutralisationstest jedoch zwischen $1:79$ und $1:4.096$.

4 Serumproben, die einen hohen Spiegel komplementbindender Antikörper ($1:64$) aufwiesen, lagen auch im Neutralisationstest erheblich über den sonst gefundenen Werten. Die Titer schwankten zwischen $1:5.801$ (1 Pferd) und $1:8.192$ (3 Pferde). Der Durchschnittstiter betrug $1:7.594$.

Es wurde ferner an 11 Pferden geprüft, ob ein Anstieg der komplementbindenden Antikörper um 2 oder mehr Zweierpotenzen mit einem Anstieg neutralisierender Antikörper einherging. Die Ergebnisse sind in Tabelle 8 zusammengefaßt.

Tabelle 8: Titerbewegungen von 11 Pferden in der KBR und im NT

KBR-An- stieg um 2^n n =	Pferd Nr.	Beobach- tungs- zeitraum (Monate)	KBR-Titer		NT-Titer	
			1.Probe	2.Probe	1.Probe	2.Probe
2	1	2	1:2	1:8	1:128	1:128
	2	17	1:2	1:8	1:128	1:181
	3	5	1:2	1:8	<1:4	1:32
	4	4	1:4	1:16	1:1.024	1:512
	5	4	1:4	1:16	1:512	1:362
3	6	2	1:4	1:32	1:8	1:362
	7	4	<1:2	1:8	<1:4	1:512
4	8	2,5	1:2	1:32	<1:4	1:256
	9	2,5	1:4	1:64	<1:4	1:128
5	10	2,5	<1:2	1:32	<1:4	1:181
	11	1,2	<1:2	1:32	<1:4	1:256

Stieg der Titer zweier Serumproben in der KBR um 2 Zweierpotenzen an, so blieb der Spiegel der neutralisierenden Antikörper bei 4 Pferden (Nr. 1, 2, 4 und 5) weitgehend konstant oder änderte sich höchstens um eine Zweierpotenz nach oben oder unten. Bei Pferd Nr. 3 war im Neutralisationstest ein Anstieg von 5 Zweierpotenzen zu beobachten.

Anstiege um 3 oder mehr Zweierpotenzen in der KBR gingen mit einem deutlichen Titeranstieg im Neutralisationstest einher (Pferde Nr. 6 bis 11).

4. B e s p r e c h u n g d e r E r g e b n i s s e

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, daß nach künstlicher Infektion von 4 Meerschweinchen und 2 Pferden mit dem Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - neben neutralisierenden auch komplementbindende Antikörper gebildet wurden. Diese Antikörper ließen sich in der direkten Komplementbindungsreaktion (KBR) nachweisen. Die erreichten Titer lagen bei den Meerschweinchen zwischen 1:64 (Tier Nr. 1) und 1:128 (Tiere Nr. 2, 3 und 4). Die Titer der neutralisierenden Antikörper betrugen 1:181 (Tier Nr. 1), 1:128 (Tiere Nr. 2 und 4) und 1:256 (Tier Nr. 3).

Die Diskrepanz zwischen den Titern der neutralisierenden und komplementbindenden Antikörper ist bei den Versuchspferden größer als bei den Meerschweinchen. Obwohl eine Parallelität im Anstieg der neutralisierenden und komplementbindenden Antikörper nach künstlicher Infektion vorhanden war, standen sich auf dem Höhepunkt der Antikörperbildung KBR-Titer von 1:32 (Stute) bzw. 1:64 (Wallach) und NT-Titer von 1:5.794 (Stute) und 1:6.884 (Wallach) gegenüber.

Das vakuumdialysierte Antigen erwies sich in der KBR mit dem Meerschweinchen-Immunserum Nr. 1 gegenüber dem methanolfällten Virusantigen und der virushaltigen Zellkulturflüssigkeit als überlegen.

Die Eignung dieses Antigens für Felduntersuchungen wurde an 247 Serumproben von 105 Pferden aus 8 Berliner Beständen geprüft. Bei 92 dieser Bestandspferde (87,6%) konnten positive Titer zwischen 1:2 und 1:64 ermittelt werden, während 13 Serumproben (12,4%) in der KBR negativ (Titer <1:2) waren.

Je 10 Pferdeseren mit KBR-Titern von $<1:2$, $1:4$ und $1:16$ und 4 Seren mit dem Titer $1:64$ wurden zusätzlich im Neutralisationstest auf neutralisierende Antikörper hin untersucht. In Seren mit positiven KBR-Titern ($\geq 1:2$) waren stets neutralisierende Antikörper nachzuweisen. Hingegen fanden sich in der KBR-negativen Gruppe ($<1:2$) neben 7 auch im NT negativen Seren 3 Proben mit NT-Titern zwischen $1:284$ und $1:368$.

Dieser Befund muß nicht unbedingt auf eine geringere Empfindlichkeit der KBR hinweisen. Vielmehr wäre es denkbar, daß, ähnlich wie bei der Rhinopneumonitis des Pferdes, die komplementbindenden Antikörper nach einer Infektion früher unter die Grenze der Nachweisbarkeit absinken als die neutralisierenden Antikörper, die noch längere Zeit erfaßt werden können (12).

Die Feststellung, daß KBR-negative Seren auch im Neutralisationstest negative oder nur niedrige Titer hatten und KBR-positive Seren im NT immer positiv waren, spricht für die Spezifität des verwendeten KBR-Antigens.

Eine weitgehende Übereinstimmung trifft für die Häufigkeit des Vorkommens komplementbindender und neutralisierender Antikörper in der Berliner Pferdepopulation zu. TEUFEL und KELLER (19) stellten bei 88% der untersuchten Pferde neutralisierende Antikörper gegen das Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - fest. Dieser Prozentsatz unterscheidet sich nur wenig von dem, der für die KBR-positiven Pferde ermittelt wurde, wobei zu bemerken ist, daß etwa 30 Serumproben von Pferden stammen, die bereits von TEUFEL und KELLER im NT untersucht worden waren.

Die Übereinstimmung der Ergebnisse der KBR und des NT steht im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen, die CHAPPLE, HEAD und TYRELL (4) bei Prüfung von Menschenseren auf Antikörper gegen das menschliche Rhinovirus HGP erzielten.

Die Autoren stellten fest, daß eine Parallelität zwischen neutralisierenden und komplementbindenden Antikörpern nicht nachzuweisen war. Nach künstlicher Infektion von 13 Versuchspersonen mit diesem Stamm stiegen im Gegensatz zu den neutralisierenden Antikörpern die Titer der KBR-Antikörper nicht an.

Von 11 Pferden, die in der KBR einen Titeranstieg um 2 und mehr Zweierpotenzen aufwiesen, wurde je ein Serumpaar zusätzlich im NT untersucht. Bei 5 Serumpaaren, die in mehreren Versuchsansätzen nur um 2 Zweierpotenzen in der KBR anstiegen, schwankte der Spiegel der NT-Antikörper bei 4 Pferden nur innerhalb des Signifikanzbereichs des ersten Wertes. Bei einem Pferd kam es zu einem Anstieg von $<1:4$ auf $1:32$. Wenn eine Erhöhung der KBR-Titer um 3 und mehr Zweierpotenzen auftrat, stiegen auch die NT-Antikörper an.

Die KBR scheint für die serologische Diagnostik der Rhinovirusinfektion neben dem NT geeignet zu sein. Sie hat letzterem gegenüber den Vorteil, daß ihre Durchführung einfach ist und besonders im Mikrotitersystem eine große Anzahl von Seren auf einmal geprüft werden kann. Ein Nachteil der KBR besteht darin, daß im Vergleich zum NT nur relativ niedrige Titer erreicht werden. Möglicherweise kann durch eine noch verbesserte Antigenherstellung eine Annäherung an die in der Regel hohen Titer des Neutralisationstests erzielt werden.

5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wird die direkte Komplement-bindungsreaktion mit dem Rhinovirus equi 1 - Stamm NM₁₁ - beschrieben.

Mit einem durch Vakuumdialyse eingeeengten Antigen ließen sich im Serum künstlich infizierter Meerschweinchen KBR-Titer zwischen 1:64 und 1:128 nachweisen.

Die Titer zweier ebenfalls künstlich infizierter Pferde betrugen 1:32 bzw. 1:64 und lagen erheblich unter den Titern der neutralisierenden Antikörper, für die Werte von 1:5.794 und 1:6.884 ermittelt wurden.

An insgesamt 247 Serumproben von 105 Pferden aus 8 Berliner Beständen wurde die Eignung der KBR für Felduntersuchungen geprüft. 87,6% der untersuchten Pferde hatten komplementbindende Antikörper mit Titern zwischen 1:2 und 1:64 gegen das Virus ausgebildet.

Vergleichende Untersuchungen von Seren in der KBR und im Neutralisationstest ergaben, daß die KBR sowohl für die Aufstellung eines Antikörperkatasters als auch für die serologische Diagnostik der Rhinovirusinfektion anwendbar ist.

6. Summary

THE COMPLEMENT FIXATION TEST WITH THE EQUINE RHINOVIRUS STRAIN NM₁₁ (SEROTYPE 1) AND ITS SUITABILITY FOR SEROLOGICAL DIAGNOSIS OF THE DISEASE

The purpose of this work was to present evidence and describe the direct complement fixation test to aid in the diagnosis of equine rhinovirus infection.

The antigen used in this serological test was the equine rhinovirus strain NM₁₁ (serotype 1) which was concentrated by vacuumdialysis. It was possible to detect the complement fixing antibodies in samples of sera of infected guinea pigs with titers between 1:64 to 1:128.

The CF-titers of two artificially infected horses were 1:32 and 1:64 respectively. The sera used for the complement fixation were also tested by the virus-neutralization test. The complement-fixation titers of the sera were lower than the neutralizing titers which ranged from 1:5.794 to 1:6.884.

247 sera samples from 105 horses in Berlin were tested by the complement-fixation procedure for equine rhinovirus. 87,6% of the horse sera had titers ranging from 1:2 to 1:64.

In view of the results obtained from field trials it was evident that the CFT is as suitable as NT in studying the epizootology and for diagnosis of the disease.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Burrows, R. Laboratory diagnosis of some virus infections of the upper respiratory tract of the horse
Equine Vet. J. 1, 32 (1968/69)
- 2 Burrows, R. Equine rhinoviruses
in: "Equine Infectious Diseases 2"
Proc. 2nd Int. Conf. on Equine Infectious Diseases, Paris
S. Karger, Basel 1970, S. 154
- 3 Chapple, P.J. und Harris, W.J.
Biophysical studies of a rhinovirus
Nature (Lond.) 209, 790 (1966)
- 4 Chapple, P.J., Head, B. und Tyrell, D.A.J.
A complement fixing antigen from an m rhinovirus
Arch. Virusforsch. 21, 123 (1967)
- 5 Dans, P.E., Forsyth, B.R. und Chanock, R.M.
Density of infectious virus and complement-fixing antigens of two rhinovirus strains
J. Bact. 91, 1605 (1966)
- 6 Ditchfield, J. und Macpherson, L.W.
The properties and classification of two new rhinoviruses recovered from horses in Toronto, Canada
Cornell Vet. 55, 181 (1964)
- 7 Ditchfield, J., Macpherson, L.W. und Zbitnew, A.
Upper respiratory disease in thoroughbred horses
Can. J. Comp. Vet. 29, 18 (1965)
- 8 Ditchfield, J. Rhinoviruses and parainfluenza viruses of horses
J. Amer. Vet.Med.Ass. 155, 384 (1969)

- 9 Kärber, G. Beitrag zur kollektiven Behandlung
pharmakologischer Reihenversuche
Naunyn-Schmiedebergs Arch. exper.
Path. Pharmac. 162, 480 (1931)
- 10 Korant, B.D., Lonberg-Holm, K.K. und Halperen, S.
Structural polypeptids of three
rhinoviruses
Biochem.Biophys.Res.Comm. 41, 477 (1970)
- 11 Mayer, M.M., Osler, A.G., Bier, O.G. und Heidelberger, M.
The activating effect of magnesium and
other cations on the hemolytic function
of complement
J. exp. Med. 84, 535 (1946)
- 12 Mayr, A. und Pette, J.
Zur Differenzierung, Diagnose und
Bekämpfung virusbedingter Erkrankungen
des Pferdes unter besonderer Berücksichtigung
der heimischen Krankheiten
Berl.Münch. tierärztl.Wschr. 81, 372 (1968)
- 13 Mayr, A. Recent developments in respiratory
infectious diseases of horses
in:"19. Congreso mundial de medicina
veterinaria y zootecnia"
Mexico 1971, Vol 1, S. 395
- 14 Plummer, G. An equine respiratory virus with
enterovirus properties
Nature (Lond.) 195, 519 (1962)
- 15 Plummer, G. und Kerry, J.
Studies on an equine respiratory virus
Vet. Rec. 74, 967 (1962)
- 16 Plummer, G. An equine respiratory enterovirus
Arch. Virusforsch. 12, 694 (1963)
- 17 Schwöbel, W. und Siedentopf, V.
Charakterisierung eines drei Jahre
alten Zellstammes aus der Schweineniere
und Untersuchungen über sein Verhalten
gegenüber dem Virus der MKS
Zbl. Bakt. I, Orig. 181, 3 (1961)

- 18 Sever, J.L. Application of a microtechnique
to viral serological investigation
J. Immunol. 88, 320 (1962)
- 19 Teufel, P. und Keller H.
Das Vorkommen neutralisierender
Antikörper gegen den equinen
Rhinovirusstamm NM₁₁ in Berliner
Pferdebeständen
Berl.Münch.tierärztl.Wschr.83, 466 (1970)
- 20 Todd, J.D. Comments on rhinoviruses and
parainfluenza viruses of horses
J. Amer. Vet.Med.Ass. 155, 387 (1969)
- 21 Traub, E., Thein, P. und Kesting, F.
A simple potency test for foot- and-
mouth disease vaccines in mice and
comparison of results with those of
potency tests in cattle
Zbl. Vet.Med. B, 17, 389 (1970)
- 22 Tyrell, D.A.J. und Chanock, R.M.
Rhinoviruses: a description
Science, 141, 152 (1962)
- 23 Tyrell, D.A.J. Rhinoviruses
Virologic Monographs Vol 2, S. 67
Springer, Wien, New York (1968)
- 24 Wilson, J.L., Bryans, J.T., Doll, E.R. und Tudor, L.
Isolation of a newly identified
equine respiratory virus
Cornell Vet. 55, 425 (1965)

Zum Abschluß meiner Arbeit möchte ich
Herrn Prof. Dr. H. Hartwig für die
Überlassung des Themas herzlich danken.

Mein besonderer Dank gilt Herrn
Dr. P. Teufel für die Einweisung in das
Arbeitsgebiet und die Unterstützung bei
der Durchführung der Versuche sowie
Herrn Dr. H. Keller für wertvolle klini-
sche Hinweise und die Beschaffung der
Proben.

Herrn Prof. Dr. H. J. Wintzer, Direktor
der Klinik für Pferdekrankheiten an der
Freien Universität Berlin, möchte ich
für die Bereitstellung der Versuchspferde
danken.

Ferner danke ich allen Mitarbeitern des
Instituts für ihre Hilfsbereitschaft.

Lebenslauf

Am 22.12.1946 wurde ich als dritter Sohn des Stellmachermeisters Heinrich Becker und seiner Ehefrau Minna, geb. Vogt in Balhorn (Hessen) geboren.

Von 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule meines Heimatortes und von 1957 an die Wilhelm-Filchner-Gesamtschule (Gymnasium) in Wolfhagen, an der ich am 1. 3.1966 das Abitur bestand.

Im Sommersemester 1966 begann ich das Studium der Veterinärmedizin an der Freien Universität Berlin und legte dort am 21. 3.1968 das Physikum und am 1. 4.1971 das Staatsexamen ab.

Die Bestallung als Tierarzt erhielt ich am 5. 5.1971.

Seit dem 1. 4.1971 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Institut für Veterinär-Hygiene der Freien Universität Berlin tätig.

